

## 胆管発癌・進展過程におけるKeap1-Nrf2経路の寄与の解明

著者	鍋島 立秀
号	89
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第4046号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129484">http://hdl.handle.net/10097/00129484</a>

氏 名	なべしま たつひで 鍋島 立秀
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2020年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	胆管発癌・進展過程における Keap1-Nrf2 経路の寄与の解明
論文審査委員	主査 教授 正宗 淳 教授 高瀬 圭 教授 笹野 公伸

## 論文内容要旨

胆道癌は早期発見が困難であり、非切除例に対する有効治療の欠如のためいまだ予後不良な消化器癌である。胆道癌の新規治療開発にはその進展に関わる分子メカニズムの解明が不可欠である。Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) - NF-E2-related factor 2 (Nrf2)経路は酸化ストレスにより活性化し、抗酸化遺伝子を含む多くの遺伝子発現を制御することで細胞・臓器機能を保護している。同経路は様々な癌で活性化しており、癌進展や治療抵抗性の獲得に寄与することが明らかとなっている。

本検討ではヒト胆道癌手術検体を用いて、一部の症例で NRF2 の分解に関わる KEAP1 発現低下がみられることを見出した。肝特異的に変異 K-ras および p53 を発現するマウスに Keap1 conditional knockout を付加したモデルマウスを作成し、胆管細胞への分化傾向を示す異型胆管上皮の増生がみられること、一部のマウスでは周囲臓器への浸潤や遠隔転移を来す浸潤癌が形成されることを確認した。Keap1 欠損付加に伴い発現が増加する遺伝子群をマイクロアレイにて抽出したところ、Nrf2 の代表的な標的遺伝子である NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (Nqo1)や Glutathione S-transferase mu 1 (Gstm1)に加え、胆管分化に関わる転写因子、Sox4 および Sox9 の増加が判明した。免疫染色では Sox9 陽性を示す異型胆管上皮の増生が確認され、Keap1-Nrf2 経路の活性化による Sox9 誘導が発癌促進に寄与していると考えられた。ヒト胆管癌組織においても KEAP1 陰性・NQO1 陽性を示す群では KEAP1 陽性・NQO1 陰性群より有意に SOX9 発現が高率であった。

さらに、Keap1 欠損による Nrf2 活性化が他の消化器癌モデルにおいても発癌促進効果を有しているかを明らかにするため、脾特異的な変異 K-ras および p53 発現により浸潤性脾癌を生じる KPC マウスへ Keap1 conditional knockout を付加して検討した。脾癌モデルマウスでは脾特異的な Keap1 欠損と変異 K-ras 発現によって脾実質の著明な変性脱落が進行し、吸収不良により致死性的となることが明らかになった。脾においては既報で KPC マウスへの Nrf2 ノックアウト付加が癌進展を抑制することが報告されているが、Keap1 欠損による持続的な Nrf2 活性化は必ずしも癌進展を促進しないとの結果であった。

本研究により、胆管癌では Keap1 の機能喪失による Nrf2 活性化が他の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異と協調して癌進展に寄与している可能性が示された。Nrf2 活性化の程度や下流の標的遺伝子発現レベルによる予後予測は困難であったが、抗癌剤への感受性や進展形式との関連、新規薬剤スクリーニングへの応用など今後の検討につながる知見であると考えられる。また、脾癌モデルマウスでの解析結果から Keap-Nrf2 経路のもつ context-specific な作用について、臓器横断的に評価する必要性も示唆された。薬剤の全身投与による Nrf2 経路への介入に際してはこのような観点からの知見集積が望まれる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 .....胆管発癌・進展過程における Keap1-Nrf2 経路の寄与の解明.....

所属専攻・分野名 .....医科学専攻 ..... 消化器病態学分野.....

学籍番号 B6MD5095 .....氏名 鍋島 立秀.....

胆道癌は早期発見が困難であり、非切除例に対する有効治療の欠如のためいまだ予後不良な消化器癌である。胆道癌の新規治療開発にはその進展に関わる分子メカニズムの解明が不可欠である。Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) - NF-E2-related factor 2 (Nrf2)経路は酸化ストレスにより活性化し、酸化遺伝子を含む多くの遺伝子発現を制御することで細胞・臓器機能を保護している。同経路は様々な癌で活性化しており、癌進展や治療抵抗性の獲得に寄与することが明らかとなっている。

本検討ではヒト胆道癌手術検体を用いて、一部の症例で NRF2 の分解に関わる KEAP1 発現低下がみられることを見出した。肝特異的に変異 K-ras および p53 を発現するマウスに Keap1 conditional knockout を付加したモデルマウスを作成し、胆管細胞への分化傾向を示す異型胆管上皮の増生がみられること、一部のマウスでは周囲臓器への浸潤や遠隔転移を来す浸潤癌が形成されることを確認した。Keap1 欠損付加に伴い発現が増加する遺伝子群をマイクロアレイにて抽出したところ、Nrf2 の代表的な標的遺伝子である NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (Nqo1)や Glutathione S-transferase mu 1 (Gstm1)に加え、胆管分化に関わる転写因子、Sox4 および Sox9 の増加が判明した。免疫染色では Sox9 陽性を示す異型胆管上皮の増生が確認され、Keap1-Nrf2 経路の活性化による Sox9 誘導が発癌促進に寄与していると考えられた。ヒト胆管癌組織においても KEAP1 陰性・NQO1 陽性を示す群では KEAP1 陽性・NQO1 陰性群より有意に SOX9 発現が高率であった。

さらに、Keap1 欠損による Nrf2 活性化が他の消化器癌モデルにおいても発癌促進効果を有しているかを明らかにするため、脾特異的な変異 K-ras および p53 発現により浸潤性脾癌を生じる KPC マウスへ Keap1 conditional knockout を付加して検討した。脾癌モデルマウスでは脾特異的な Keap1 欠損と変異 K-ras 発現によって脾実質の著明な変性脱落が進行し、吸収不良により致死性的となることが明らかになった。脾においては既報で KPC マウスへの Nrf2 ノックアウト付加が癌進展を抑制することが報告されているが、Keap1 欠損による持続的な Nrf2 活性化は必ずしも癌進展を促進しないとの結果であった。

本研究により、胆管癌では Keap1 の機能喪失による Nrf2 活性化が他の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異と協調して癌進展に寄与している可能性が示された。Nrf2 活性化の程度や下流の標的遺伝子発現レベルによる予後予測は困難であったが、抗癌剤への感受性や進展形式との関連、新規薬剤スクリーニングへの応用など今

後の検討につながる知見であると考えられる。また、膀胱癌モデルマウスでの解析結果から Keap-Nrf2 経路のもつ context-specific な作用について、臓器横断的に評価する必要性も示唆された。薬剤の全身投与による Nrf2 経路への介入に際してはこのような観点からの知見集積が望まれる。

発癌における Keap 1 の役割について、多くの実験結果を用いて検討しており、十分学位に値する研究である。第一次審査において指摘された不備が、適切に修正されている。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。